

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

BESTIMMUNG VON VITAMIN K IN HUMANPLASMA MITTELS
KAPILLARSÄULEN-GAS-CHROMATOGRAPHIE

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Frank Klein

aus Irlich

Mainz, 1984 1985

Aus dem Pharmakologischen Institut der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

BESTIMMUNG VON VITAMIN K IN HUMANPLASMA MITTELS
KAPILLARSÄULEN-GAS-CHROMATOGRAPHIE

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Frank Klein

aus Irlich

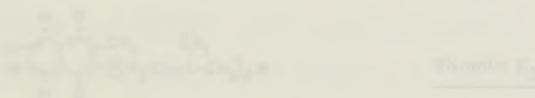
Mainz, 1984

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL UND METHODE	6
1. Quantitative Analyse von Vitamin K ₁ und Vitamin K ₁ -2,3-epoxid im menschlichen Plasma	6
1.1. Reagenzien	6
1.2. Vorbereitung der Plasmaproben zur quantita- tiven gaschromatographischen Analyse	6
1.2.1. Lipidextraktion	6
1.2.2. Säulenchromatographie	7
1.3. Flüssig-Gas-Chromatographie	12
1.3.1. Flüssig-Gas-Chromatographie mit gepackten Säulen	12
1.3.2. Flüssig-Gas-Chromatographie mit einer Dünnschichtquarzkapillarsäule	13
1.4. Bestimmung der Wiederfindungsrate und Eichung der Methode	14
2. Versuchspersonen	16
3. Verabreichung von Vitamin K ₁ und Entnahme von Blutproben	16
4. Pharmakokinetische Analyse	20
III. ERGEBNISSE	22
1. Lipidextraktion und Säulenchromatographie	22
2. Flüssig-Gas-Chromatographie	26
2.1. Flüssig-Gas-Chromatographie mit gepackten Säulen	26
2.2. Flüssig-Gas-Chromatographie mit der Dünnschicht- quarzkapillarsäule	26
3. Einfluß der säulenchromatographischen Vor- reinigung der Plasmaproben auf die Ergebnisse der Flüssig-Gas-Chromatographie	32
4. Pharmakokinetik von Vitamin K ₁ nach intrave- nöser und oraler Applikation bei Gesunden und bei Patienten mit Lebercirrhose	35
IV. DISKUSSION	49

V. ZUSAMMENFASSUNG	59
VI. LITERATURVERZEICHNIS	61
VII. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	68

Lebenslauf



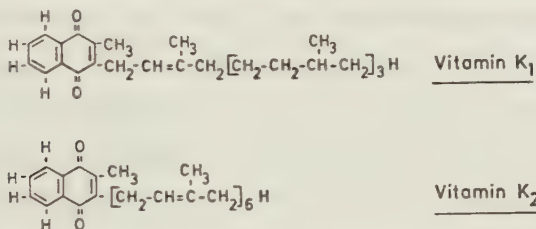
Die Identifizierung der natürlichen 2-Tocopherol-Formen ist von Bedeutung für die Beurteilung der Vitaminaktivität. Während Vitamin E₁ (Tocopherol) die Hauptform des Vitamins darstellt, wird auch Vitamin E₂ (Tocopherol) in geringen Mengen in natürlichen Vitaminpräparaten gefunden. Die Identifizierung dieser beiden Formen ist wichtig für die Beurteilung der Vitaminaktivität.

Während der 30-er Jahre wurde die Identifizierung der natürlichen 2-Tocopherol-Formen als wichtig angesehen. In dieser Zeit wurde Vitamin E₁ (Tocopherol) als die Hauptform des Vitamins identifiziert. In den 40-er Jahren wurde Vitamin E₂ (Tocopherol) als eine weitere Form des Vitamins identifiziert. Die Identifizierung dieser beiden Formen ist wichtig für die Beurteilung der Vitaminaktivität.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. EINLEITUNG

Vitamin K gehört zu einer Gruppe von Chinonverbindungen, die für die Synthese von Blutgerinnungsfaktoren in Säugetieren unerlässlich sind. Den allen K-Vitaminen gemeinsamen Grundkörper bezeichnet man als 2-Methyl-1,4-naphtochinon. Die beiden Hauptvertreter der K-Vitamine, Vitamin K₁ und Vitamin K₂, besitzen in 3-Position eine Phytylseitenkette (Vitamin K₁) bzw. Farne-sylseitenkette (Vitamin K₂).



Die Biosynthese der natürlichen K-Vitamine ist Pflanzen und Bakterien vorbehalten. Während Vitamin K₁ ausschließlich von Pflanzen synthetisiert wird und damit ein essentieller Nahrungsmittelbestandteil ist, kann Vitamin K₂ auch von den im Darm der Säugetiere lebenden Bakterien, insbesondere grampositiven Bakterien, synthetisiert werden.

Mitte der 30-er Jahre entdeckte Dam den Zusammenhang zwischen Vitamin K-Defizit, reduzierter Gerinnungsfähigkeit des Blutes und Plasmahypoprothrombinämie (DAM, 1935). Es dauerte jedoch über 30 Jahre, bis biochemische Untersuchungen die Wirkungsweise von Vitamin K₁ beim Aufbau der Blutgerinnungsfaktoren erklären halfen. Ausgehend

von der Entdeckung Matschiner's, daß Vitamin K₁ zu Vitamin K₁-2,3-epoxid metabolisiert wird (MATSCHINER et al, 1970), gelangte man zu folgender Vorstellung von der Wirkungsweise von Vitamin K₁:

Vitamin K₁ wird für die im Anschluß an die Translationsphase stattfindende γ -Carboxylierung von Glutaminsäureresten von in der Leber gebildeten Prekursorproteine der Blutgerinnungsfaktoren II (Prothombin), VII (Prokonvertin), IX (Christmas-Faktor) und X (Stuart-Prower-Faktor) benötigt, die damit ihre gerinnungsphysiologische Aktivität erhalten (SHAH und SUTTIE, 1971; STENFLO et al, 1974; NELSESTUEN et al, 1974; STENFLO und SUTTIE, 1977; OLSON und SUTTIE, 1977; SUTTIE, 1980). Die γ -Carboxylierung ist eng mit der Oxidation des reduzierten Vitamin K₁ zum Vitamin K₁-2,3-epoxid (WILLINGHAM und MATSCHINER, 1974; SADOWSKI et al, 1977; SUTTIE et al, 1980; LARSON et al, 1981), durch das im rauhen endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle gebundene Enzym Vitamin K₁-2,3-Epoxidase (CARLISLE und SUTTIE, 1980) verbunden. Ein weiteres, mikrosomal gebundenes Enzym, Vitamin K₁-epoxid-Reduktase, reduziert anschließend Vitamin K₁-2,3-epoxid wieder zum Vitamin K₁-chinon (BELL und MATSCHINER, 1972; ZIMMERMANN und MATSCHINER, 1974; WILLINGHAM und MATSCHINER, 1974). Die Hemmung dieses Enzyms ist für die während einer Therapie mit oralen Antikoagulantien zu beobachtende Akkumulation von Vitamin K₁-2,3-epoxid in der Leber (MATSCHINER et al, 1970; CALDWELL et al, 1974; SADOWSKI und SUTTIE, 1974) und im Plasma (SHEARER et al, 1977; SCHMIDT et al, 1979; PARK

et al, 1979; BJORNSSON et al, 1979; BECHTOLD und JÄHNCHEN, 1979; BECHTOLD et al, 1983) verantwortlich und wird deshalb als Angriffspunkt der oralen Antikoagulantien angesehen (WHITLON et al, 1978; HILDEBRANDT und SUTTIE, 1982).

Die Oxidation des Vitamin K₁ zum Vitamin K₁-2,3-epoxid über die Zwischenstufe Vitamin K₁-hydrochinon und die anschließende Reduktion von Vitamin K₁-2,3-epoxid zu Vitamin K₁ wird als Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus bezeichnet (Abbildung 1).

Obwohl die Beziehung zwischen Vitamin K₁, Vitamin K₁-2,3-epoxid und in den Vitamin K₁-Stoffwechsel eingreifenden Substanzen (insbesondere den oralen Antikoagulantien) im letzten Jahrzehnt Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten war, waren pharmakokinetische Untersuchungen zum Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus beim Menschen bisher durch methodische Probleme limitiert. Die verfügbaren Erkenntnisse zur Pharmakokinetik von Vitamin K₁ beim Menschen (SHEARER et al, 1970, 1972, 1973, 1974, 1977; SHEPHERD et al, 1977; BJORNSSON et al, 1979; BECHTOLD et al, 1983) wurden praktisch ausschließlich nach Applikation von isotopenmarkierten Verbindungen gewonnen, da bis zu dieser Zeit keine geeigneten analytischen Methoden zur seriellen Bestimmung von nichtmarkiertem Vitamin K₁ in biologischen Flüssigkeiten zur Verfügung standen. Die beschriebenen hochdruckflüssigkeitschromatographischen (LEFEVRE et al, 1979; SHEARER et al, 1980;

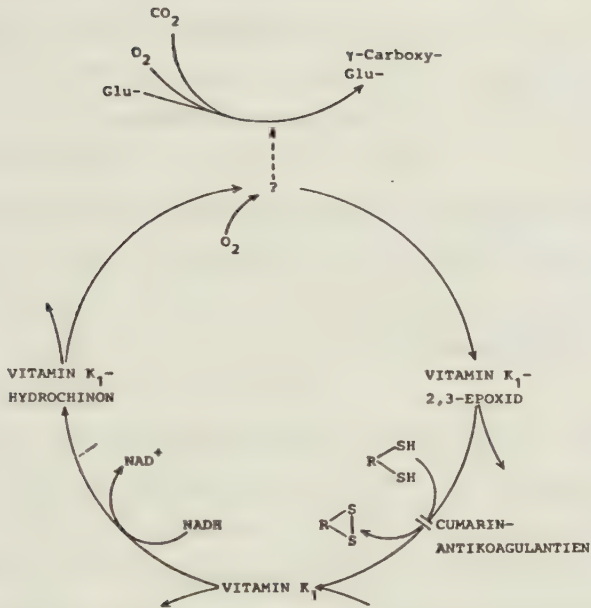


Abb. 1: Vitamin K₁-Epoxid-Zyklus in der Leber
(nach Bell, 1978; Whitlon et al, 1978)
Glu- : Glutaminsäure

HAROON et al, 1980; CHIU et al, 1981; LEFEVRE et al, 1982) bzw. polarographischen (HART et al, 1982) Methoden zur Bestimmung von Vitamin K₁ oder Vitamin K₁-2,3-epoxid sind sehr aufwendig und daher für größere Probenzahlen nur bedingt geeignet. Die von BECHTOLD und JÄHNCHEN (1979) beschriebene gaschromatographische Bestimmungsmethode ist extrem von der Sorgfalt beim Packen der Säulen abhängig; zudem kommt es bei wiederholter Injektion von Plasmaextrakten in das System schnell zur Peakverbreiterung und damit zum Verlust der Trennung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, eine Methode zur Bestimmung von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid im menschlichen Plasma auszuarbeiten, und damit die Pharmakokinetik und den Metabolismus von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid im Menschen zu untersuchen. Mit Hilfe der Methode sollte dann die Pharmakokinetik von Vitamin K₁ bei gesunden Probanden charakterisiert werden, und mit den Daten, die an einem Kollektiv von an Lebercirrhose erkrankten Patienten gewonnen wurden, verglichen werden.

II. MATERIAL UND METHODE

1. Quantitative Analyse von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid im menschlichen Plasma

1.1. Reagenzien

Die verwendeten Lösungsmittel besaßen alle den Reinheitsgrad pro analysi (E. Merck AG, Darmstadt, BRD) und wurden ohne weitere Reinigung benutzt. Cis- und trans-Vitamin K₁ (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphtochinon), cis- und trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphtochinon-2,3-epoxid), Vitamin K₂(20)-Razemat (Menachinon-4), sowie die kommerziell erhältlichen Konakion^(R)Ampullen 10 mg (1 ml Ampullen enthalten 10 mg Vitamin K₁) wurden freundlicherweise von Dr. Weber und Dr. Gloor (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

1.2. Vorbereitung der Plasmaproben zur quantitativen gaschromatographischen Analyse

1.2.1. Lipidextraktion

Plasmaproben von 0,2 bis 0,8 ml wurden in Zentrifugengläser mit einem Gesamtvolumen von 15 ml pipettiert. Jeder Plasmaprobe wurden 0,05 ml einer äthanolischen Lösung des internen Standards Vitamin K₂(20)(2 µg/ml), 2 ml Aqua bidest und

10 ml eines Gemisches von Äthanol und Hexan (50:50, v/v) hinzugefügt und für 30 Minuten auf einem Rotationsmischer bei 25 U/Min extrahiert. Nach zehnminütigem Zentrifugieren bei 3000 U/Min wurde die obere Hexanschicht in Spitzröhrchen überführt und unter Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Alle verwendeten Gläser und Verschlüsse wurden vor Gebrauch mit Hexan zur Eliminierung von fettlöslichen Verunreinigungen gespült. Die Plasmaproben und Extrakte wurden während des gesamten Arbeitsvorganges bis zum Einbringen in den Gaschromatographen vor Licht geschützt.

In Tabelle 1 sind die extrahierbaren hexanlöslichen Plasmalipide zusammengestellt.

1.2.2. Säulenchromatographie

Die nach der Lipidextraktion unter Stickstoff zur Trockene eingedampften Plasmaproben wurden in 50 μ l des jeweils verwendeten Elutionsmittels aufgenommen und auf die Gravitationssäule aufgetragen.

Es wurden Glassäulen mit einer Gesamtlänge von 20,5 cm, einem Außendurchmesser von 7,0 mm und einem Innendurchmesser von 5,0 mm verwendet. Die stationäre Phase war Kieselgel (Korngröße 0,2 - 0,5 mm, 35 - 70 ASTM, E. Merck AG, Darmstadt). Das Kieselgel wurde vor Einfüllen in die Säule für 60 Minuten auf 100°C im Trockenschrank erhitzt und somit aktiviert. Nach dem Abkühlen

	Konzentration (mg/100 ml)	MG
Neutralfette	8 - 500	800 - 900
Fettsäuren, unverestert	8 - 30	200 - 310
Cholesterin, total	130 - 260	373 - 700
- Ester	90 - 190	600 - 700
- frei	40 - 70	373
Phosphoglyceride, total	150 - 250	700 - 800
- Phosphatidylcholin	100 - 200	785
- Phosphadyläthanolamin	0 - 30	743
Sphingomyelin	10 - 50	708
Lipide, total	285 - 675	373 - 900

Tabelle 1: Lipide (mg/100 ml) im menschlichen Plasma

auf Raumtemperatur wurde es in Lösungsmittel aufgeschlämmt und anschließend in die Gravitationssäule gefüllt. Die Füllhöhe des Kieselgels wurde von 5 cm bis 26 cm variiert, wobei eine optimale Füllhöhe von 16 cm gefunden wurde. Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C) und Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/Essigsäureäthylester 98 : 2, v/v dienten als Elutionsmittel. Daneben wurden noch weitere in Tabelle 2 aufgeführte Lösungsmittel erprobt. Die Elutionsmittel wurden immer so gewählt, daß zunächst in einer Vorwaschphase die leicht löslichen Lipide mit einem apolaren Lösungsmittel eluiert wurden. Daran anschließend erfolgte die Elution der K-Vitamine mit einem Lösungsmittelgemisch höherer Polarität. Die Auswahl der verschiedenen Lösungsmittel erfolgte anhand der Dielektrizitätskonstante, die als Ordnungsgröße für die Polarität von Flüssigkeiten verwendbar ist und eine Einordnung der Lösungsmittel nach steigender Polarität in eine elutrope Reihe ermöglicht. Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C) mußte vor Gebrauch im Ultraschallbad weitgehend von darin gelösten Luftblasen befreit werden, da sich sonst im verwendeten Schlauchsystem Luftblasen bildeten, die konfluieren, die Fließgeschwindigkeit veränderten und schließlich zum Abbruch des Versuchs zwangen.

Vorwaschphase

Hexan

Toluol

Cyclohexan

Petroleumbenzin (Siedebereich
40 - 60°C)/Hexan

Petroleumbenzin (Siedebereich
40 - 60°C)

Elutionsphase

Hexan

Hexan/Acetonitril

Hexan/2-Propanolol

Hexan/Diäthyläther

Hexan/Essigsäureäthylester

Toluol/Acetonitril

Cyclohexan/Diäthyläther

Cyclohexan/Essigsäureäthylester

Hexan/Diäthyläther

Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/
Diäthyläther

Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)
Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/

Acetonitril

Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/
Diäthyläther

Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/
Essigsäureäthylester

Hexan/Diäthyläther

Tabelle 2: Die in der säulenchromatographischen Abtrennung der Vitamine

K_1 , K_2 -2,3-epoxid und K_2 von den Plasmalipiden erprobten Lösungsmittel

Das Lösungsmittel wurde den Säulen über einen Polyäthylenschlauch zugeführt, der mit seinem einen Ende in ein mit Lösungsmittel gefülltes Glasgefäß eintauchte und mit dem entgegengesetzten Ende über eine Teflonverbindung direkt an den Säulenkopf anschloß. Wurden mehrere Säulen gleichzeitig betrieben, so gingen die zu den einzelnen Säulen führenden Polyäthylenschläuche von in Reihe geschalteten Glasrechen ab, die dann ihrerseits über einen gemeinsamen Polyäthylenschlauch an das als Lösungsmittelreservoir dienende Glasgefäß angeschlossen waren. In den zuführenden Polyäthylenschlauch wurde ein Dreiwegehahn zwischengeschaltet, so daß durch einfaches Umschalten des Dreiwegehahnes ein zweites Lösungsmittel zu den Säulen geleitet werden konnte. Der Eluatablauf erfolgte über einen Teflonschlauch von 1,6 mm Außendurchmesser und 0,7 mm Innendurchmesser.

Die für die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase maßgebliche Druckdifferenz wurde durch den Höhenunterschied zwischen dem Lösungsmittelspiegel im Vorratsgefäß und der Abtropfhöhe des Eluats aus dem abführenden Teflonschlauch bestimmt. Durch Höhenverstellbarkeit des abführenden Teflonschlauchs ließ sich die Fließgeschwindigkeit beliebig variieren und blieb, einmal eingestellt, über die Versuchsdauer konstant.

Das Lösungsmittel enthaltende Gefäß stand auf einem in der Höhe verstellbaren Tisch, um den über die Versuchsdauer absinkenden Lösungsmittelspiegel durch Höherdrehen des Tisches zu kompensieren. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase wurde von 0,1 bis 0,5 ml/Min variiert und eine optimale Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/Min ermittelt. Hierbei war die Vorwaschphase nach 40 - 45 Minuten abgeschlossen, die Vitamine K₁ und K₁-2,3-epoxid wurden zwischen der 70. und 75. Minute eluiert.

1.3. Flüssig-Gas-Chromatographie

1.3.1. Flüssig-Gas-Chromatographie mit gepackten Säulen

Die Flüssig-Gas-Chromatographie mit gepackten Säulen (BECHTOLD und JÄHNCHEN, 1979) wurde mit einem Gaschromatographen der Firma DANI (Modell 3600), versehen mit einem 10 m Ci⁶³Ni Electron-Capture Detektor, durchgeführt. Eine silanisierte O-förmige Glassäule von 190 cm Länge und 2,2 mm Innendurchmesser wurde mit 3 % OV-17 auf Anakrom Q der Korngrößenfraktion 90 - 100 mesh (NEN Chemie, Dreieichenhain, BRD) gepackt.

Die Analysentemperatur des Säulenofens betrug 302°C, die Temperatur des Injektorblocks 315°C und die des Detektors 305°C. Als Trägergas wurde sauerstoff- und wasserdampffreier Stickstoff

verwendet (Trärgasströmung 80 ml/Min). Vor Gebrauch wurde die Säule für 24 Stunden bei 315°C ausgeheizt.

Die zur gaschromatographischen Analyse durch Lipidextraktion bzw. Lipidextraktion und säulenchromatographische Vorreinigung entsprechend vorbereiteten Plasmaproben wurden unmittelbar vor der Injektion in 10 - 25 µl n-Hexan gelöst. Hiervon wurden dann 1 - 2 µl auf die Säule injiziert.

1.3.2. Flüssig-Gas-Chromatographie mit einer Dünnschichtquarzkapillarsäule

Zur Analyse wurde ein Kapillarsäulen-Gaschromatograph der Firma DANI (Modell 3900), ausgestattet mit einem Probengeber mit Stromteiler und einem 10 m Ci⁶³Ni Electron-Capture Detektor verwendet. Bei der Säule handelte es sich um eine kommerziell verfügbare Dünnschichtquarzkapillarsäule von 25 m Länge und 0,32 mm Innendurchmesser, mit einer chemisch gebundenen flüssigen Phase (CPtmSil 5 CB, Filmdicke 0,12 µ; CHROMPACK NEDERLAND B.V., Middelburg/Niederlande).

Die nach Lipidextraktion und Säulenvorreinigung unter Stickstoff zur Trockene eingedampften Plasmaextrakte wurden unmittelbar vor der Injektion in 40 µl n-Heptan aufgenommen. Davon wurden 0,8 - 1,5 µl in den auf 280°C geheizten, geschlossenen Injektorblock injiziert. Die Probenaufgabe erfolgte

nach der Methode der Direkteinspritzung von GROB und GROB (1969), ohne Stromteilung. Für die Zeit der Einspritzung und für weitere 40 Sekunden wurde die Kapillarsäule 20 - 40°C unter dem Siedepunkt des Lösungsmittels bei 60 - 80°C gehalten. Nach 40 Sekunden wurde das Stromteilungsventil geöffnet und der Injektor mit Trägergas durchgespült. Es wurde ein Stromteilungsverhältnis von 1 : 50 gewählt. Danach wurde der Säulenofen auf die isotherme Analysentemperatur von 285°C mit einer Geschwindigkeit von ca. 40°C pro Minute aufgeheizt. Die Detektortemperatur betrug 330°C. Als Trägergas diente sauerstoff- und wasserdampffreies Helium (Einlaßdruck 1,2 bar), als Spülgas für den Detektor sauerstoff- und wasserdampffreier Stickstoff (Flußrate 30 ml/Min).

1.4. Bestimmung der Wiederfindungsrate und Eichung der Methode

Die Wiederfindungsrate wurde mit ^3H -Vitamin K_1 und ^3H -Vitamin K_1 -2,3-epoxid (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) überprüft. Diese wurden den Plasmaproben vor Lipidextraktion und Säulenchromatographie in definierter Menge zugegeben. Durch Überführen der Hexanphase nach Lipidextraktion sowie des Eluats nach Lipidextraktion und Säulenchroma-

tographie in Plastikvials konnte die nach Lipidextraktion bzw. nach Lipidextraktion und Säulenchromatographie verbleibende Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Flüssigkeitsszintillationszähler, Packard Tri Carb, Modell 3380) bestimmt werden. Anhand eines ausgedruckten Kanalverhältnisses, das vom Gerät nach der Methode des externen Standards ermittelt wurde, konnte mit Hilfe einer Quenchkurve, die mit einem in Toluol gelösten Tritium-Standard erstellt wurde, die Zählausbeute ermittelt und die ausgedruckten Werte entsprechend umgerechnet werden.

Zur Kalibrierung des Analyseverfahrens wurden Standardlösungen mit bekannten Konzentrationen (12,5; 25; 50; 100; 150; 200 ng/ml) an Vitamin K₁ (Konaktion^(R) Ampullen 10 mg) und trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid hergestellt. Das Verhältnis der Peakhöhen von Vitamin K₁ und trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid zum internen Standard Vitamin K₂(20) wurde gegen die jeweilige Konzentration von Vitamin K₁ und trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid aufgetragen. Das verwandte trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid enthielt ungefähr 10 % cis-Vitamin K₁-2,3-epoxid und in den kommerziell erhältlichen Konaktion^(R) Ampullen 10 mg (Vitamin K₁) ließ sich neben Vitamin K₁ ca. 6 % trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid nachweisen. Um diese 10 % bzw. 6 % mußten die Konzentrationsangaben

entsprechend korrigiert werden. Die so erhaltenen Meßwerte wurden durch eine Regressionsgerade verbunden. Die unbekannten Plasmakonzentrationen wurden anhand der ermittelten Regressionsgeraden bestimmt. Plasmaproben, die mehr als 200 ng/ml Vitamin K₁ oder Vitamin K₁-2,3-epoxid enthielten, wurden mit Leerplasma entsprechend verdünnt. Mit jeder Meßreihe unbekannter Plasmaproben wurden Eichplasmen mitgeführt.

2. V e r s u c h s p e r s o n e n

Die Untersuchungen wurden an 4 gesunden Probanden (2 weiblich, 2 männlich; Alter zwischen 24 und 46 Jahre, mittleres Alter $30,5 \pm 10,5$ Jahre), sowie an 5 stationären Patienten (1 weiblich, 4 männlich; Alter zwischen 39 und 65 Jahre, mittleres Alter $51,2 \pm 11,6$ Jahre) mit bioptisch gesicherter Lebercirrhose durchgeführt. Ätiologisch lag den Lebercirrhosen bei allen Patienten eine alkoholische Genese zugrunde. Die wichtigsten laborchemischen Parameter, Begleiterkrankungen, sowie die verabreichten Medikamente sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt.

3. V e r a b r e i c h u n g v o n V i t a m i n K₁ u n d E n t n a h m e v o n B l u t p r o b e n

Zur Ermittlung der pharmakokinetischen Daten von Vitamin K₁ wurde dieses allen vier gesunden Probanden intravenös und oral appliziert. Den fünf Patienten mit Lebercirrhose wurde Vitamin K₁ intravenös und dreien zusätzlich oral verabreicht.

Patient	SGOT (U/l)	AP (U/l)	γ -GT (U/l)	Bilirubin (mg/100 ml)	Kreatinin (mg/100 ml)	Eiweiß (g/100 ml)	Albumin (g/100 ml)	Cholesterin (mg/100 ml)	Triglyceride (mg/100 ml)
L.F.	36	183	43	2,5	1,1	6,46	2,9	133	65
C.H.	7	125	45	1,1	1,0	7,8	4,1	126	115
A.M.	24	283	218	0,7	1,0	7,2	3,3	127	148
H.K.	68	347	322	3,3	1,1	8,3	2,8	208	225
K.R.	7	309	61	0,5	0,9	6,4	3,2	52	59

Tabelle 3: Patienten mit Lebercirrhose: Laborchemische Parameter

Patient	Histologische Diagnose	Begleitkrankheiten	Medikamente
L.F.	kleinknotige Lebercirrhose	Nephrolithiasis Herzinsuffizienz Osteoporose	Aldactone 2 x 50 mg
C.H.	kleinknotige Lebercirrhose	keine	Aldactone Saltucin 3 x 100 mg Lasix 2 x 40 mg Zyloric 1 x 300 mg
A.M.	kleinknotige Lebercirrhose mit Verfettung des Rest- parenchyms	Zustand nach B II-OP (Magencazinom)	keine
H.K.	Leberparenchymverfettung mit hochgradiger portaler und intralobulärer Fibrose	Pityriasis versicolor	Aldactone Saltucin 2 x 100 mg
K.R.	Periportale Fibrose mit be- ginnendem Umbau	chronisch rezidivieren- de Pankreatitis Maldigestion und Malabsorption Zustand nach B II-OP Diabetes mellitus	Aldactone Saltucin 2 x 50 mg Claforan 2 x 2 g Euglucon 3 x 3,5 mg Imodium 4 x 2 mg Quantalan 3 x 4 g Pankreon Granulat 5 x 6 g Rebectin 1 x 5 mg Rebectin forte 1 x 50 mg

Tabelle 4: Patienten mit Lebercirrhose:

Histologische Diagnose, Begleitkrankheiten und Medikation

Die Untersuchungen wurden mit kommerziell erhältlichen Konaktion^(R)Ampullen 10 mg (1 Ampulle = 1 ml enthält 10 mg Vitamin K₁) für die intravenöse und mit kommerziell erhältlichen Konaktion^(R)Tropfen (1 ml enthält 20 mg Vitamin K₁) für die orale Applikation durchgeführt.

Vitamin K₁ (0,14 mg/kg Körpergewicht) wurde für die parenterale Applikation in 250 ml Laevulose gelöst und in maximal 20 Minuten über eine Cubitalvene infundiert. Für die orale Applikation wurden die Konaktion^(R)Tropfen (0,28 mg/kg Körpergewicht bei Patienten, 0,14 mg/kg Körpergewicht bei gesunden Versuchspersonen) unmittelbar vor Versuchsbeginn in mit kakaobutterbeschichtete Gelatinekapseln (hergestellt von Professor Dr. F. Moll, Fachbereich Pharmazie, Universität Mainz) gefüllt. Die Gelatinekapseln hatten ein Fassungsvermögen von je 0,5 ml. Die Versuchspersonen blieben 8 Stunden vor sowie 3 Stunden nach Verabreichung von Vitamin K₁ nüchtern.

Heparinisierte Blutproben von 5 ml wurden über einen am Unterarm liegenden Venenverweilkatheter unmittelbar vor und mehrmals nach Verabreichung von Vitamin K₁ über einen Zeitraum von 32 - 48 Stunden abgenommen. Alle Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert, das Plasma anschließend abgehoben und bei -20°C bis zur späteren Analyse eingefroren.

Bei Lebercirrhose-Patienten wurden vor und 24 Stunden nach Applikation von Vitamin K₁ die Thromboplastin-

zeit nach Quick und die partielle Thromboplastinzeit (PTT) bestimmt.

4. P h a r m a k o k i n e t i s c h e A n a l y s e

Die pharmakokinetischen Daten wurden unter Zugrundelegung eines Zwei-Kompartimente-Modells ermittelt. Der Konzentrationszeitverlauf von Vitamin K₁ im Plasma wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate unter Verwendung eines NONLIN-Rechenprogrammes (METZLER et al, 1974) bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstanten α und β und die zugehörigen Halbwertszeiten $t_{1/2\alpha}$ und $t_{1/2\beta}$ ($t_{1/2\alpha(\beta)} = 0,693/\alpha(\beta)$) entsprechen der Steigung des Anfangsabschnittes bzw. des terminalen Abschnittes der Blutspiegelkurve bei halblogarithmischer Darstellung. Die Bestimmung der Fläche unter der Konzentrationszeitkurve (AUC) erfolgte mit Hilfe der Trapezregel und Extrapolation bis Unendlich. Die apparente Clearance wurde aus applizierter Dosis und AUC ($Cl = \text{Dosis}/\text{AUC}$), das apparente Verteilungsvolumen aus applizierter Dosis und AUC $\times \beta$ ($V = \text{Dosis}/\text{AUC} \times \beta$) und das apparente Verteilungsvolumen unter den Bedingungen des Fließgleichgewichtes mit einer modellunabhängigen Methode (BENET und GALEAZZI, 1979) errechnet. Die biologische Verfügbarkeit (F) wurde durch Vergleich der Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven nach intravenöser und oraler Applikation unter Berücksichtigung der jeweils applizierten Dosis ermittelt:

$$F (\%) = \frac{AUC \text{ oral} \times Dosis \text{ i.v.}}{AUC \text{ i.v.} \times Dosis \text{ oral}} \times 100$$

III. ERGEBNISSE

1. Lipidextraktion und Säulenchromatographie

Mit der beschriebenen Extraktionsmethode wurde Vitamin K₁ zu $92,66 \pm 2,1 \%$ ($n = 6$) und Vitamin K₁-2,3-epoxid zu $93,1 \pm 2,0 \%$ ($n = 6$) in die Hexanphase überführt. Die Wiederfindungsrate der K-Vitamine nach der säulenchromatographischen Vorreinigung wurde mehrfach bestimmt und betrug für Vitamin K₁ zwischen 76 % und 92 % ($\bar{x} = 85,4 \pm 5,05 \%$, $n = 7$) und für Vitamin K₁-2,3-epoxid zwischen 64 % und 71,5 % ($\bar{x} = 66,6 \pm 3,07 \%$, $n = 5$). Abbildung 2 zeigt die Elutionskurven der Vitamine K₁ und K₁-2,3-epoxid in einem Konzentrations-Zeit-Diagramm. Diese Diagramme wurden für Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid jeweils getrennt ermittelt. Mit der beschriebenen säulenchromatographischen Methode wurden die Vitamine K₁ und K₁-2,3-epoxid zwischen der 70. und 75. Minute eluiert.

Die den säulenchromatographischen Trennungsvorgang beeinflussenden Parameter (Säulenlänge, Lösungsmittel, Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase) wurden experimentell ermittelt.

Die Säulenlänge wurde zwischen 5 und 26 cm variiert. Mit Kieselgelsäulen kleiner als 16 cm konnte keine befriedigende Reduktion interferierender Lipide gefunden werden. Auf der anderen Seite verbesserte eine Verlängerung der Kieselgelsäulen über 16 cm hinaus die spätere GC-Analyse nicht mehr.

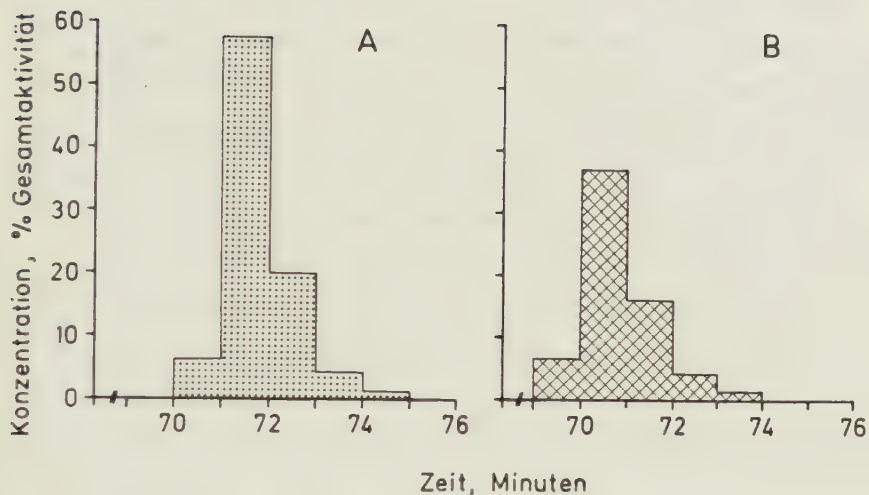


Abb. 2: Konzentrations-Zeit-Diagramm von Vitamin K₁ (A) und Vitamin K₁-2,3-epoxid (B) nach säulenchromatographischer Abtrennung der K-Vitamine von den Plasmalipiden.
Stationäre Phase: Kieselgel (Korngröße 0,2 - 0,5 mm, 35 - 70 ASTM);
mobile Phase: Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C) und Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/Essigsäureäthylester 98:2, v/v;
Fließgeschwindigkeit 0,4 ml/Min.

Die außer Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C) und Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/Essigsäureäthylester 98 : 2, v/v erprobten Lösungsmittel führten unter sonst gleichen chromatographischen Bedingungen entweder zu einer niedrigeren Wiederfindungsrate der K-Vitamine oder zu Chromatogrammen mit ungünstigem Verhältnis von Grundrauschen zu Signalpeak. So konnten mit Hexan und Hexan/Essigsäureäthylester 98 : 2, v/v bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/Min lediglich 60 % des auf die Säule aufgetragenen Vitamin K₁ eluiert werden. Acetonitril und Toluol führten zu völlig unbefriedigenden Chromatogrammen, die keine Reduktion der Plasmalipide erkennen ließen.

Die besten Chromatogramme ergaben folgende Lösungsmittel:

- Cyclohexan - Cyclohexan/Diäthyläther 97 : 3, v/v
- Cyclohexan - Cyclohexan/Essigsäureäthylester 98 : 2, v/v
- Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)-Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/Essigsäureäthylester 98 : 2, v/v

Die Vorreinigung der Plasmaextrakte mit Cyclohexan ergab im Chromatogramm eine unruhigere Baseline als die Vorreinigung mit Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C). Das ungünstigere Verhältnis von Grundrauschen zu Signalpeak ließ eine eindeutige Identifizierung des Substanzpeaks bei Substanzkonzentrationen unter 15 ng nicht mehr zu. Als Lösungsmittel wurden deshalb Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C) und Petroleumbenzin (Siedebereich 40 - 60°C)/Essigsäure-

Äthylester 98 : 2, v/v benutzt. Diese Lösungsmittelkombination reduzierte die Plasmalipide, bezogen auf das Feuchtgewicht, um über 60 % im Vergleich zum ungereinigten Extrakt.

Die optimale Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase betrug 0,4 ml/Min. Eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit führte zwar zu einer höheren Ausbeute an Vitamin K₁, verschlechterte aber die Abtrennung der Lipide. Andererseits ergab eine Verringerung der Fließgeschwindigkeit auch eine geringere Wiederfindungsrate. Diese betrug bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/Min 63 % Vitamin K₁, bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/Min 85 %.

2. Flüssig-Gas-Chromatographie

2.1. Flüssig-Gas-Chromatographie mit gepackten Säulen

Abbildung 5 A zeigt das Chromatogramm eines Plasmas (extrahiertes Plasmavolumen 0,4 ml), dem je 100 ng Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid hinzugefügt wurden. Das Plasma wurde durch Lipidextraktion ohne weitere säulenchromatographische Reinigung zur GC-Analyse vorbereitet.

Die Signalpeaks von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid sind nicht vollständig voneinander getrennt. Eine Trennung der cis- und trans-Isomere von Vitamin K₁-2,3-epoxid war auf gepackten Säulen nicht möglich. Wiederholte Injektionen von Plasmaextrakten führten zu Peakverbreiterung und Verlust der Trennleistung der gepackten Säule.

2.2. Flüssig-Gas-Chromatographie mit der Dünnschichtquarzkapillarsäule

Abbildung 3 zeigt ein Chromatogramm nach Injektion von jeweils 2 ng cis- und trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid, Vitamin K₁ (Konaktion^(R)) und Vitamin K₂(20). Alle vier Bestandteile wurden vollständig voneinander getrennt. Eine Separation der cis- und trans-Isomere von Vitamin K₁ war mit dem beschriebenen analytischen Verfahren allerdings nicht möglich.

Der dem Vitamin K₂(20) entsprechende Signalpeak hatte an seinem Ende eine kleine "Schulter". Diese könnte entweder auf eine unbekannte Verunreinigung

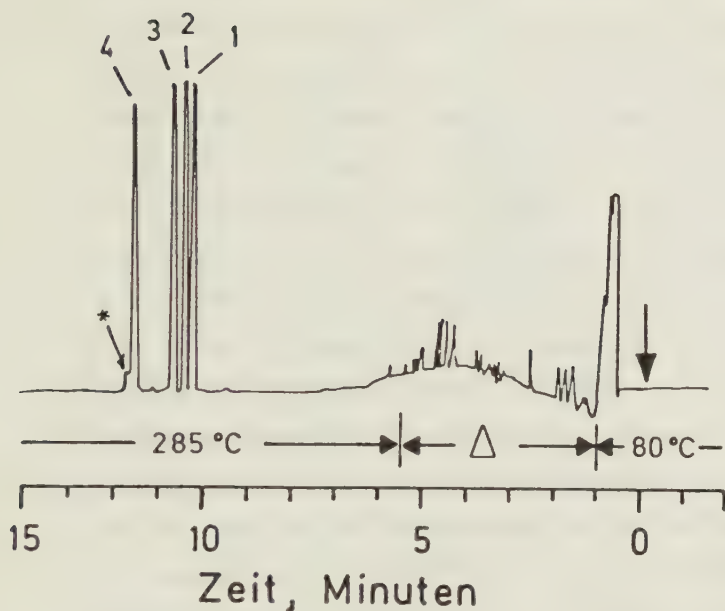


Abb. 3: Flüssig-Gas-Chromatogramm von der Dünnfilm-quarzkapillarsäule nach Direkteinspritzung von jeweils 2 ng trans- und cis-Vitamin K₁-2,3-epoxid, 2 ng Vitamin K₁-Razemat und 2 ng Vitamin K₂(20)-Razemat (Menachinon 4), gelöst in 1 μ l n-Heptan.

Peak 1 = trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid,

Peak 2 = cis-Vitamin K₁-2,3-epoxid,

Peak 3 = Vitamin K₁-Razemat,

Peak 4 = Vitamin K₂(20)-Razemat.

* = Abtrennung einer Verunreinigung, die dem cis- oder trans-Isomer von Vitamin K₂(20) entsprechen könnte.

↓ = Injektion.

oder auf eine nur unvollständige Abtrennung des cis- oder trans-Isomers von Vitamin K₂(20) zurückzuführen sein. Da die Isomere von Vitamin K₂(20) nicht erhältlich waren, kann eine eindeutige Interpretation nicht gegeben werden. Vitamin K₁-2,3-epoxid bestand zu ungefähr 90 % aus trans- und 10 % aus cis-Vitamin K₁-2,3-epoxid. Die Konaktion^(R) Ampullen 10 mg enthielten ca. 94 % Vitamin K₁ und 6 % trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid. Beides konnte mit Hilfe der Gaschromatographie nachgewiesen werden.

Die Retentionszeit für das zuletzt eluierte Vitamin K₂(20) betrug etwa 12 Minuten. Berücksichtigt man, daß das Abkühlen des Säulenofens von der isothermen Analysentemperatur von 285°C auf die Injektionstemperatur von ca. 80°C ungefähr 6 - 8 Minuten dauerte, so ergab sich ein Injektionsintervall von 20 - 30 Minuten.

In Abbildung 4 sind die Chromatogramme eines Plasmas, dem 15 ng/ml Vitamin K₁ und 15 ng/ml trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid (Abbildung 4 A) hinzugefügt wurden und eines Leerplasmas (Abbildung 4 B) gegenübergestellt. Der cis-Vitamin K₁-2,3-epoxid-Peak ist zwischen dem Vitamin K₁-Peak und dem trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid-Peak sichtbar. Das Leerplasma von 10 gesunden Personen und Patienten war frei von mit den Signalpeaks interferierenden, endogen im Plasma vorhandenen Substanzen.

Die Eichkurven für Vitamin K₁ und trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid waren sowohl von gereinigten als auch ungereinigten Plasmen bis zu einer Konzentration

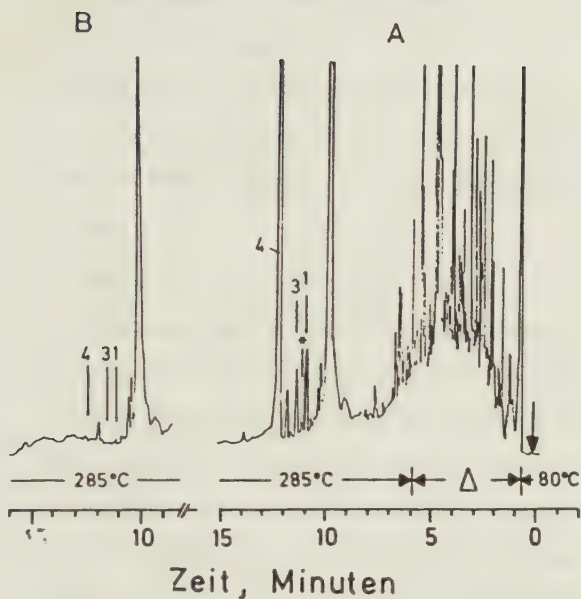


Abb. 4: Flüssig-Gas-Chromatogramme von der Dünnschichtquarzkapillarsäule.

Chromatogramm A nach Direkteinspritzung eines ungereinigten Extraktes aus 0,4 ml Humanplasma, dem 15 ng/ml trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid (1), 15 ng/ml Vitamin K₁ (3) und 250 ng/ml Vitamin K₂(20) (4) hinzugefügt wurden.

* zeigt den eben noch sichtbaren cis-Vitamin K₁-2,3-epoxid-Peak. Der Peak entspricht einer Menge von ungefähr 1,5 ng/ml, wenn man davon ausgeht, daß das dem Plasma zugesetzte trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid ungefähr 10 % des cis-Isomers enthielt.

Chromatogramm B nach Direkteinspritzung eines ungereinigten Extraktes aus 0,4 ml Humanplasma, das keine K-Vitamine enthielt.

von 200 ng/ml linear (r 0,98; Schnittpunkt mit der Y-Achse unter 0,01).

Mit der hier beschriebenen Methode lag die Nachweisgrenze von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid in Plasma bei 5 ng/ml, für Reinsubstanzen bei 10 bis 20 pg.

In Tabelle 5 ist die Genauigkeit und die Reproduzierbarkeit der Methode wiedergegeben. Es bestand eine gute Übereinstimmung zwischen den den Plasma-proben hinzugefügten Konzentrationen von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid und den dann mittels GC-Analyse bestimmten. Darüber hinaus zeigten die an verschiedenen Tagen ermittelten Eichkurven nur geringe Variationen in der Steigung (Variationskoeffizient unter 10 % innerhalb eines Zeitraumes von 3 Monaten).

Konzentration (ng/ml)		Vitamin K ₁		Vitamin K ₁ -2,5-epoxid		Vitamin K ₁ -2,5-epoxid	
Vitamin K ₁		Vitamin K ₁		Vitamin K ₁ -2,5-epoxid		Vitamin K ₁ -2,5-epoxid	
tatsächliche Plasma-		gefunden		tatsächliche Plasma-		gefunden	
Konzentration		Konzentration		Konzentration		Konzentration	
1	2	1	2	1	2	1	2
25,0	150,0	27,3	143,8	25,0	150,0	27,4	152,4
25,0	150,0	27,8	146,3	25,0	150,0	27,9	151,2
25,0	150,0	29,8	144,9	25,0	150,0	30,6	151,1
25,0	150,0	25,6	154,5	25,0	150,0	23,2	153,5
25,0	-	25,4	-	25,0	-	24,0	-
25,0	-	30,4	-	25,0	-	28,2	-
25,0	-	22,5	-	25,0	-	29,5	-
$\bar{x} \pm s_x$							
25,0	150,0	26,2 ± 3,2	154,6 ± 8,7	25,0	150,0	26,1 ± 3,2	152,1 ± 1,2
Variationskoeffizient		12 %	6 %			15 %	1 %

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der analytischen Methode

3. Einfluß der säulenchromatographischen Vorreinigung der Plasmaproben auf die Ergebnisse der Flüssig-Gas-Chromatographie

In Abbildung 5 sind zwei Chromatogramme von gepackten Trennsäulen und in Abbildung 6 zwei Chromatogramme der Dünnschichtquarzkapillarsäule mit und ohne Säulenvorreinigung gegenübergestellt. Das extrahierte Plasmavolumen betrug mit Säulenvorreinigung 0,8 ml, ohne Säulenvorreinigung 0,4 ml.

Die abgebildeten Chromatogramme verdeutlichen:

- a) Die säulenchromatographische Vorreinigung der Plasmaextrakte verringert das Grundrauschen.
- b) Der in den Chromatogrammen ungereinigter Plasmen mit einem * versehene Peak fehlt in Chromatogrammen säulenchromatographisch gereinigter Extrakte.

Die Kapillarsäule wurde bei säulenchromatographisch nicht vorgereinigten Extrakten aus 0,8 ml Plasma mit Substanz überlastet. Dies führte dazu, daß die Chromatogramme nicht mehr reproduziert werden konnten.

Bereits nach wenigen Injektionen kam es zur Peakverbreiterung mit Verlust der Trennung. Nach säulenchromatographischer Vorreinigung der Plasmaextrakte trat eine Substanzüberlastung unter den Bedingungen der Kapillarsäulenchromatographie nicht mehr auf.

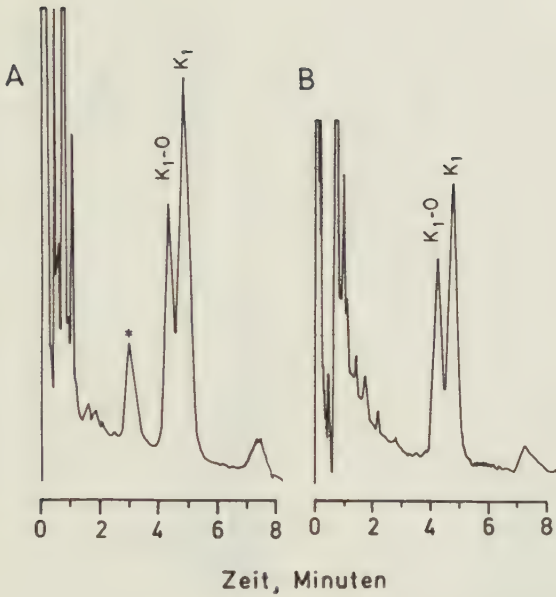


Abb. 5: Flüssig-Gas-Chromatogramme von der gepackten Säule.

Die Signalpeaks entsprechen jeweils 100 ng/ml Plasma Vitamin K₁-2,3-epoxid und Vitamin K₁. Chromatogramm A (extrahiertes Plasmavolumen 0,4 ml) ohne, Chromatogramm B (extrahiertes Plasmavolumen 0,8 ml) mit säulenchromatographischer Reinigung. * entspricht dem durch Plasmalipide hervorgerufenen Störpeak.

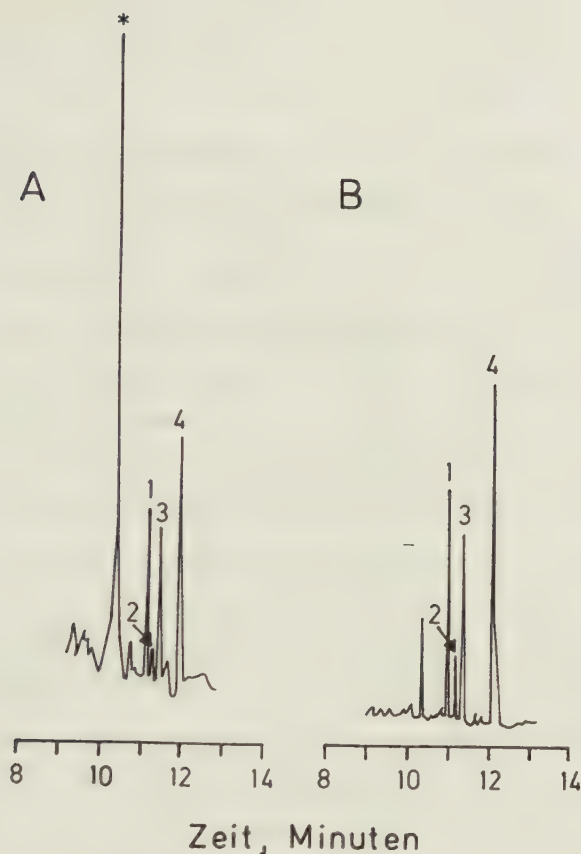


Abb.6: Flüssig-Gas-Chromatogramme von der Dünnfilmquarzkapillarsäule.

Die Signalpeaks entsprechen jeweils 60 ng/ml Plasma Vitamin K₁-2,3-epoxid (1 = trans-Vitamin K₁-2,3-epoxid, 2 = cis-Vitamin K₁-2,3-epoxid), 60 ng/ml Vitamin K₁ (3) und 100 ng/ml Vitamin K₂(20)(4). Chromatogramm A (extrahiertes Plasmavolumen (0,4 ml) ohne,

Chromatogramm B (extrahiertes Plasmavolumen 0,8 ml) mit säulenchromatographischer Reinigung.

* entspricht dem durch Plasmalipide hervorgerufenen Störpeak.

4. Pharmakokinetik von Vitamin K₁ nach intravenöser und oraler Applikation bei Gesunden und bei Patienten mit Lebercirrhose

Die nach intravenöser und oraler Applikation von Vitamin K₁ ermittelten pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle 6 und 7 für Gesunde und in Tabelle 8 und 9 für Patienten mit Lebercirrhose zusammengefaßt. Abbildung 7 zeigt die Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurven Gesunder und die Abbildungen 8 und 9 die von Patienten mit Lebercirrhose, jeweils nach einer einmaligen intravenösen Dosis von 0,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁.

Die Halbwertszeiten Gesunder lagen nach intravenöser Applikation für die Verteilungsphase ($t_{1/2\alpha}$) zwischen 0,18 und 0,82 Stunden ($\bar{x} = 0,44 \pm 0,27$ h) und für die Eliminationsphase ($t_{1/2\beta}$) zwischen 2,05 und 4,5 Stunden ($\bar{x} = 3,57 \pm 1,09$ h). Bei Patienten mit Lebercirrhose wurden für die Verteilungsphase Halbwertszeiten zwischen 0,16 und 3,18 Stunden ($\bar{x} = 1,13 \pm 1,20$ h) und für die Eliminationsphase Halbwertszeiten zwischen 1,69 und 21,57 Stunden ($\bar{x} = 6,84 \pm 8,43$ h) ermittelt. Von den fünf untersuchten Lebercirrhotikern hatten die Patienten L.F. und H.K. längere Halbwertszeiten der Verteilungs- und Eliminationsphase als die untersuchten gesunden Probanden. Bei den übrigen Patienten unterschieden sich die Halbwertszeiten nicht von denen Gesunder.

Die apparente Clearance Gesunder schwankte zwischen 2,22 und 5,11 l/h ($\bar{x} = 3,03 \pm 1,39$ l/h) und die der Patienten zwischen 1,37 und 3,52 l/h ($\bar{x} = 2,22 \pm 0,86$ l/h).

Proband	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	apparente Cl (l/h)	apparentes V_d (l)	apparentes $V_{d,ss}$ (l)
P.F.	0,40	2,05	2,22	6,56	5,10
B.K.	0,82	4,5	2,25	14,78	4,79
F.K.	0,36	4,2	5,11	30,93	10,25
F.R.	0,18	3,54	2,55	13,03	8,56
$\bar{x}$	0,44	3,57	3,03	15,33	7,18
S_x	0,27	1,09	1,39	10,36	2,67

Tabelle 6: Gesunde Probanden: Pharmakokinetische Daten nach intravenöser Applikation von 0,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁

Proband	Verzögerungszeit (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	t _{1/2α} (h)	t _{1/2β} (h)	F (%)
P.F.	1,9	5,93	131	3,39	4,79	47
B.K.	3,8	5,02	149	0,88	15,1	49
F.K.	4,5	6,15	114	0,80	8,8	57
F.R.	0,009	6,0	202	4,08	10,44	93
$\bar{x}$	2,55	5,8	149	2,29	9,78	61,5
S _x	2,02	0,51	38,1	1,7	4,27	21,44

Tabelle 7: Gesunde Probanden: Pharmakokinetische Daten nach oraler Applikation von
0,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁

Patient	t $\frac{1}{2\alpha}$ (h)	t $\frac{1}{2\beta}$ (h)	apparente Cl (l/h)	apparentes V_d (l)	apparentes $V_{d,ss}$ (l)
L.F.	1,15	6,23	2,47	22,19	8,24
C.H.	0,58	2,01	2,2	6,39	4,67
A.M.	0,57	2,7	3,52	13,75	8,08
H.K.	3,18	21,57	1,37	42,76	13,31
K.R.	0,16	1,69	1,55	3,76	3,14
$\bar{x}$	1,13	6,84	2,22	17,77	7,49
S_x	1,2	8,43	0,86	15,7	3,93

Tabelle 8: Patienten mit Lebercirrhose: Pharmakokinetische Daten nach intravenöser Applikation von 0,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁

Patient	Verzögerungszeit (h)	$t_{\max}$ (h)	$C_{\max}$ (ng/ml)	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	F (%)
L.F.	2,9	6,03	112	2,79	78,3	55
C.H.	0,009	2,07	189	3,2	47,1	41
A.M.	0,2	4,25	274	1,92	29,08	98
$\bar{x}$	1,04	4,12	191,67	2,64	51,5	64,67
S_x	1,62	1,98	81,03	0,65	24,9	29,7

Tabelle 9: Patienten mit Lebercirrhose: Pharmakokinetische Daten nach oraler Applikation von 0,28 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁

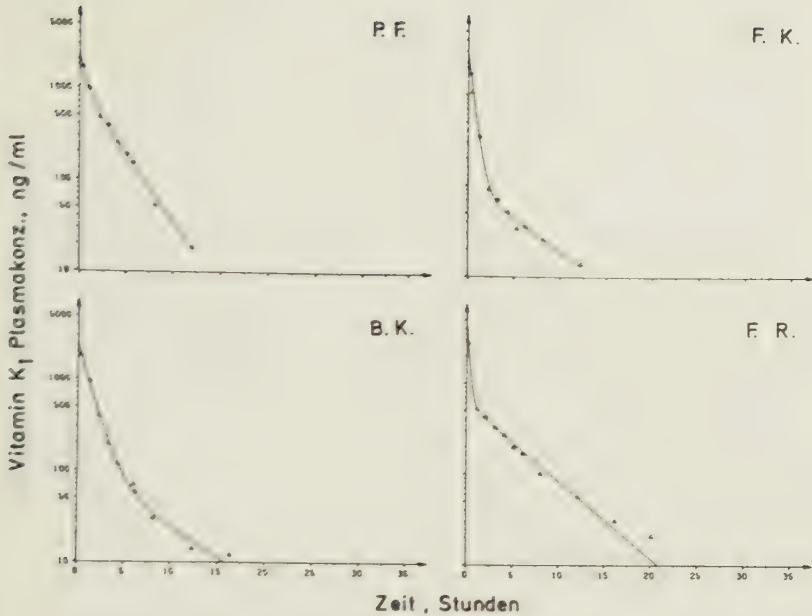


Abb. 7: Gesunde Probanden:

Konzentrations-Zeit-Verlauf von Vitamin K₁ im Plasma nach intravenöser Applikation von 0,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁.

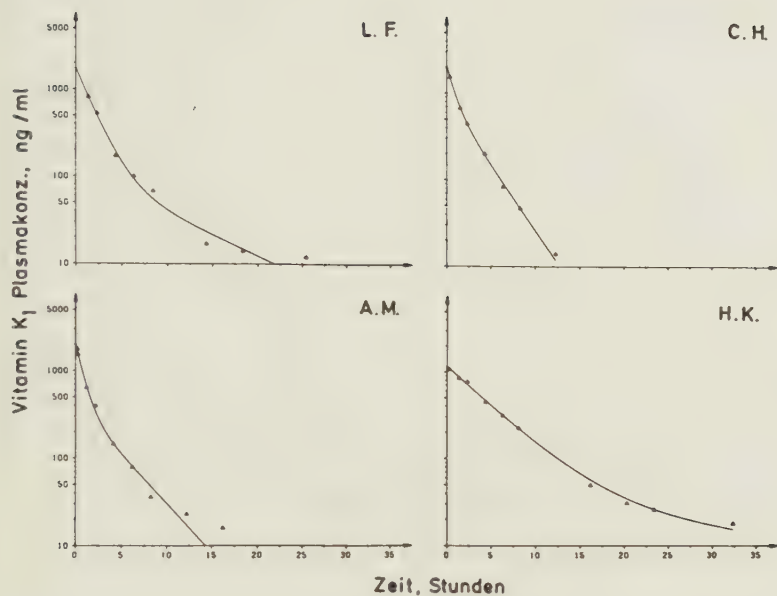


Abb. 8: Patienten mit Lebercirrhose:
Konzentrations-Zeit-Verlauf von Vitamin K₁ im
Plasma nach intravenöser Applikation von
0,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁.

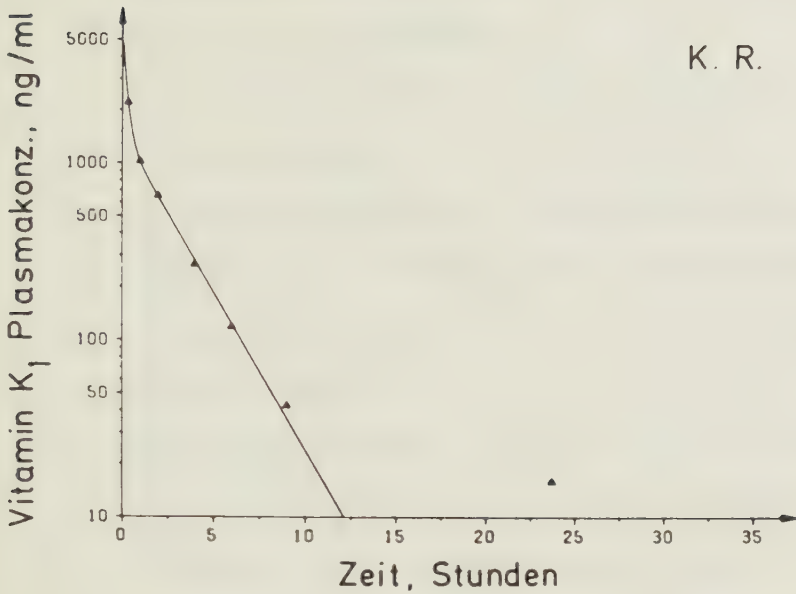


Abb. 9: Patient K.R.:

Konzentrations-Zeit-Verlauf von Vitamin K₁ im Plasma nach intravenöser Applikation von 0,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁.

Die beiden niedrigsten Werte der apparenten Clearance wurden bei den Lebercirrhotikern H.K. mit 1,37 l/h und K.R. mit 1,55 l/h gemessen.

Die apparenten Verteilungsvolumina Gesunder lagen zwischen 6,56 und 30,93 l ($\bar{x} = 16,33 \pm 10,36$ l), die von Patienten zwischen 3,76 und 42,76 l ($\bar{x} = 17,77 \pm 15,7$ l). Unter den Bedingungen des Fließgleichgewichtes wurden die apparenten Verteilungsvolumina Gesunder zwischen 4,79 und 10,25 l ($\bar{x} = 7,18 \pm 2,67$ l) und die von Lebercirrhotikern zwischen 3,14 und 13,31 l ($\bar{x} = 7,49 \pm 3,92$ l) bestimmt.

Nach einer bei Gesunden oral applizierten Dosis von 0,14 mg/kg Körpergewicht war Vitamin K₁ nach einer Verzögerungszeit $2,55 \pm 2,02$ h (0,009 bis 4,5 Stunden) im Plasma meßbar. Die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) wurde zwischen 5,02 und 6,15 Stunden ($\bar{x} = 5,8 \pm 0,51$ h) erreicht und betrug zwischen 114 und 202 ng/ml ($\bar{x} = 149 \pm 38,1$ ng/ml). Die terminale Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2 \beta}$) betrug nach oraler Verabreichung bei Gesunden im Mittel $9,78 \pm 4,27$ h (4,79 bis 15,1 Stunden). Sie war damit im Mittel um ca. 6 Stunden länger als nach intravenöser Gabe.

Patienten mit Lebercirrhose bekamen mit 0,28 mg/kg Körpergewicht eine gegenüber Gesunden doppelte Vitamin K₁-Dosis oral appliziert. Die Verzögerungszeit betrug hier $1,04 \pm 1,62$ h (0,009 bis 2,9 Stunden) und war damit kürzer als bei Gesunden. Die maximale Plasmakonzentration lag zwischen 112 und 274 ng/ml ($\bar{x} = 191,67 \pm 81,03$ ng/ml) und wurde zwischen 2,07 und 6,03 Stunden

($\bar{x} = 4,12 \pm 1,98$ h) erreicht. Nach oraler Applikation verlängerte sich die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2 \beta}$) von $6,84 \pm 8,43$ h nach intravenöser Gabe auf $51,5 \pm 24,9$ h und war um über 40 Stunden länger als die Gesunder.

In der Bioverfügbarkeit ließ sich zwischen den beiden untersuchten Gruppen kein Unterschied feststellen (Gesunde: $61,5 \pm 21,44$ %; Patienten mit Lebercirrhose: $64,67 \pm 29,7$ %). Der Patient K.R. wurde bei der Berechnung der pharmakokinetischen Daten nach oraler Applikation gesondert betrachtet, da er neben der Lebercirrhose eine, die Resorption von Vitamin K_1 bestimmende, schwere Maldigestion und Malabsorption hatte. Bei dem Patienten K.R. konnte nach oraler Vitamin K_1 -Gabe kein Vitamin K_1 im Plasma nachgewiesen werden.

In Tabelle 10 und 11 sind die maximalen Plasmakonzentrationen von Vitamin K_1 -2,3-epoxid nach intravenöser und oraler Applikation aufgeführt. Sowohl in den Plasmen Gesunder, als auch in denen von Patienten mit Lebercirrhose waren nur Spuren von Vitamin K_1 -2,3-epoxid nachweisbar.

Tabelle 12 zeigt die bei den einzelnen Patienten vor, sowie 24 Stunden nach intravenöser Applikation von Vitamin K_1 erhobenen gerinnungsphysiologischen Parameter.

Die Thromboplastinzeit nach Quick war auf $52,2 \pm 7,2$ % (Norm: 75 - 100 %) erniedrigt. Mit $38,5 \pm 5,5$ sec lag die partielle Thromboplastinzeit im Normbereich (Norm: bis 55 Sekunden). Nach intravenöser Vitamin K_1 -Applikation

Proband	Applikationsart	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)
P.F.	i.v.	21	4,0
B.K.	i.v.	30	0,37
F.K.	i.v.	-	-
F.R.	i.v.	10	3,18
P.F.	oral	-	-
B.K.	oral	14	6,0
F.K.	oral	-	-
F.R.	oral	18	3,0

Tabelle 10: Gesunde Probanden: Maximale Vitamin K₁-2,3-epoxid-Konzentrationen nach intravenöser und oraler Applikation von C,14 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁

Patient	Applikationsart	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (h)
L.F.	i.v.	22	2,33
C.H.	i.v.	20	0,37
A.M.	i.v.	12	1,2
H.K.	i.v.	-	-
K.R.	i.v.	15	4,0
L.F.	oral	-	-
C.H.	oral	-	-
A.M.	oral	22	4,25

Tabelle 11: Patienten mit Lebercirrhose: Maximale Vitamin K₁-2,3-epoxid-Konzentrationen nach intravenöser Applikation von 0,14 mg/kg Körpergewicht und oraler Applikation von 0,28 mg/kg Körpergewicht Vitamin K₁

Patient	Thromboplastinzeit nach Quick		PTT	
	(%)			
	1	2		
	1	2	(sec)	
	1	2	1	2
L.F.	52	44	41	43
C.H.	56	63	35	33
A.M.	55	72	33	31
H.K.	40	34	45	42
K.R.	58	61	-	-
$\bar{x}$	52,2	54,8	38,5	37,3
S_x	7,16	15,42	5,51	6,13

Tabelle 12: Patienten mit Lebercirrhose: Thromboplastinzeit nach Quick und partielle Thromboplastinzeit vor (1) und 24 Stunden nach (2) intravenöser Applikation von Vitamin K_1

blieben sowohl die Thromboplastinzeit nach Quick mit $54,8 \pm 15,4 \%$, als auch die partielle Thromboplastinzeit mit $37,3 \pm 6,1$ sec gegenüber den Ausgangswerten unverändert.

IV. DISKUSSION

Für den gaschromatographischen Nachweis von Arzneimitteln und anderen Substanzen in biologischem Material ist ein vorheriges Abtrennen der Matrix erforderlich. In der Regel bedient man sich hierzu einer Lösungsmittelsextraktion. Ein erster limitierender Schritt für die Sensitivität der gesamten Methode ist dabei die bei der Extraktion erzielte Ausbeute. Mit Wiederfindungsraten von über 90 %, sowohl für Vitamin K₁, als auch für Vitamin K_{1-2,3}-epoxid erfüllen die gewählten Extraktionsbedingungen diese Anforderung.

Für die bei wiederholten Injektionen von Plasmaextrakten in das gaschromatographische System zu beobachtende Peakverbreiterung mit Verlust der Trennleistung wurden in erster Linie mit den K-Vitaminen mitextrahierte Lipide verantwortlich gemacht. Hierbei stehen im Humanplasma quantitativ Cholesterinester, Phosphatidylcholin (Lecithin) und Fettsäuren im Vordergrund. Eine weitere Aufreinigung der Plasmaextrakte wurde durch die geringen Unterschiede zwischen den K-Vitaminen und den Plasmalipiden sowohl in der Polarität als auch im Molekulargewicht erschwert. Bei der Lösung ähnlicher Fragestellungen hatten andere Autoren (GALE et al, 1962; LOSITO und MILLAR, 1964; SEIFERT, 1979; SHEARER et al, 1980) mit Erfolg die Adsorptionschromatographie von K-Vitaminen auf Kieselgel erprobt.

Wie die Abbildungen 5 und 6 zeigen, konnten durch eine säulenchromatographische Vorreinigung der Plasmaextrakte deutliche Verbesserungen des Chromatogramms erreicht werden. Es traten weniger Störpeaks auf und durch die geringeren

Schwankungen der Grundlinie wurde ein besseres Verhältnis von Grundrauschen zu Signalpeak erreicht.

Ein erheblicher Nachteil der säulenchromatographischen Vorreinigung war der große zeitliche Aufwand. Die Vorreinigung von 9 Plasmaproben dauerte etwa 4 - 5 Stunden. Gerade für pharmakokinetische Untersuchungen muß der Zeitfaktor bei der Vielzahl der zu analysierenden Proben aber berücksichtigt werden.

Die gaschromatographische Bestimmung von Vitamin K₁ bzw. Vitamin K₁-2,3-epoxid wurde deshalb von gepackten Säulen auf Kapillarsäulen umgestellt. Diese bieten gegenüber gepackten Säulen den Vorteil einer besseren Auflösung der einzelnen Analysenbestandteile, kürzere Analysenzeiten und größere Empfindlichkeit für die nachzuweisenden Substanzen. In den vergangenen Jahren wurden zudem Kapillarsäulen entwickelt, deren stationäre Phasen den bei der Analyse von Vitamin K erforderlichen Temperaturen standhalten. Außerdem steht mit der Methode der Direkteinspritzung nach Grob (GROB und GROB, 1969) eine Methode zur Verfügung, die eine verlustfreie Injektion und damit quantitatives Arbeiten mit Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ermöglicht.

Auf der Dünnschichtquarzkapillarsäule führte der hohe Lipidgehalt ungereinigter Plasmen bei einem extrahierten Plasmavolumen von 0,8 ml und mehr zur Substanzüberlastung der Säule, da die maximale Belastbarkeit von Kapillarsäulen ungefähr 1000mal geringer als die von gepackten Trennsäulen ist (KAISER, 1975). Die Überlastung der Kapillarsäule bei Extraktion eines Plasmavolumens von 0,8 ml ließ sich vermeiden, wenn die Plasmaextrakte mit dem bekannt hohen Zeit-

aufwand säulenchromatographisch vorgereinigt wurden. Auf eine Säulenvorreinigung konnte jedoch verzichtet werden, wenn das extrahierte Plasmavolumen 0,4 ml und weniger betrug. Beim Vergleich der gaschromatographischen Methode auf Kapillarsäulen zur quantitativen Analyse von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid aus Humanplasma mit der von BECHTOLD und JÄHNCHEN (1979) für gepackte Säulen beschriebene Methode zeigte sich, daß sowohl auf der gepackten Säule nach Vorreinigung, als auch auf der Kapillarsäule, die untere Nachweisgrenze für Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid 5 ng/ml betrug. Die Kapillarsäule hatte gegenüber der gepackten Säule jedoch folgende Vorteile:

1. Vitamin K₁ und die Isomere von Vitamin K₁-2,3-epoxid wurden vollständig voneinander getrennt. Auf der gepackten Säule war eine Trennung der Isomere von Vitamin K₁-2,3-epoxid nicht möglich und Vitamin K₁ wurde von Vitamin K₁-2,3-epoxid nicht vollständig abgetrennt.
2. Die Kapillarsäule behielt ihre Trennleistung bei mehreren Injektionen täglich über Monate hinaus. Auf der gepackten Säule kam es trotz säulenchromatographischer Vorreinigung nach wiederholten Injektionen immer wieder zu Peakverbreiterungen und Verlust der Trennleistung.
3. Die vom selben Hersteller bezogenen Kapillarsäulen unterschieden sich nicht in der Trennleistung. Auf der gepackten Säule wurde die Trennleistung schon durch geringe Unterschiede bei der Herstellung, beim Packen und Konditionieren der Glassäule beeinflusst.

Es steht somit eine gut reproduzierbare Methode mit hoher Sensitivität zur Verfügung, die es ermöglicht, die Pharmakokinetik und den Metabolismus von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid am Menschen nach Verabreichung therapeutischer Dosen zu untersuchen.

Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven nach intravenöser Applikation von Vitamin K₁ zeigten einen biphasischen Verlauf. Die Pharmakokinetik läßt sich damit mit Hilfe eines sogenannten 2-Kompartimente-Modells beschreiben.

Die nach intravenöser Applikation von Vitamin K₁ bei gesunden Probanden gemessenen Halbwertszeiten von $t_{1/2\alpha} = 0,44 \pm 0,27$ h und $t_{1/2\beta} = 3,57 \pm 1,09$ h stimmten weitgehend mit den von anderen Untersuchern am Menschen mit Hilfe von radioaktiv markiertem Vitamin K gefundenen Werten von 0,2 - 0,43 Stunden für $t_{1/2\alpha}$ bzw. 2,0 - 3,29 Stunden für $t_{1/2\beta}$ überein (SHEARER et al, 1972; SHEPHERD et al, 1977; BJORNSSON et al, 1979). GLOOR und WISS (1966) bzw. TAGGERT (1969) konnten in Ratten zeigen, daß die dort beobachtete initiale rasche Elimination von Vitamin K aus dem Plasma nach oraler und intravenöser Applikation von radioaktiv markiertem Vitamin K mit der Anreicherung von Radioaktivität in der Leber parallel geht. Nach 2 Stunden wurden bereits 78 % der Gesamtradioaktivität in der Leber nachgewiesen. Wenn ähnliche Untersuchungen am Menschen auch bisher ausstehen, so ist doch anzunehmen, daß der initial rasche Abfall von Vitamin K₁ im Plasma auch hier durch die Aufnahme des Vitamins in die Leber zu erklären ist. Einen indirekten Beweis hierfür stellen Befunde von SHEARER et al (1972) dar, wonach bereits

20 Minuten nach der intravenösen Applikation von Vitamin K₁ beim Menschen radioaktive Metabolite im Duodenalinhalt nachzuweisen waren.

Clearance und Verteilungsvolumen sind nicht exakt quantifizierbar, da das die zyklische Interkonversion von Vitamin K₁ zu Vitamin K_{1-2,3}-epoxid und umgekehrt beschreibende pharmakokinetische Modell die tatsächlichen stöchiometrischen Verhältnisse nur annähernd erfaßt (BECHTOLD et al, 1983).

Ursache hierfür ist vor allem, daß die bisher vorliegenden biochemischen pharmakokinetischen Untersuchungen den Metabolismus von Vitamin K nur ungenügend beschreiben. So ist nicht bekannt, ob das im Vitamin K-Epoxid-Zyklus gebildete Vitamin K-hydrochinon (SIEGFRIED, 1980; SUTTIE, 1980; LARSON et al, 1981) quantitativ zu Vitamin K-epoxid oxidiert oder auch über andere bisher unbekannte Stoffwechselwege metabolisiert wird und damit in den Bilanzrechnungen der Vitamin K-Elimination berücksichtigt werden muß. So konnte gezeigt werden (FASCO und PRINCIPLE, 1980; BELL 1982), das Vitamin K-epoxid direkt, das heißt, ohne Bildung des Zwischenproduktes Vitamin K-chinon zu Vitamin K-hydrochinon reduziert werden kann. Auch hier müssen weitere Untersuchungen zeigen, inwieweit dieser Befund für quantitative pharmakokinetische Untersuchungen relevant ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Clearance und Verteilungsvolumen deshalb als apparent bezeichnet. Bei gesunden Probanden wurde die apparente Clearance mit $3,03 \pm 1,39$ l/h und das Verteilungsvolumen mit $16,3 \pm 10,4$ l bestimmt. Bei den Gesunden konnten nach intravenöser Gabe von Vitamin K keine oder nur geringe

Spuren von Vitamin K₁-2,3-epoxid im Plasma nachgewiesen werden. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen, die mit Hilfe von radioaktiv markiertem Vitamin K₁ sowohl am Menschen (SHEARER et al, 1977; BJORNSSON et al, 1979) als auch am Tier (PARK et al, 1979; SCHMIDT et al, 1979; TRENK et al, 1980; CARLISLE und BLASCHKE, 1981) erhoben wurden, überein. Der Grund für die geringe Vitamin K-epoxid-Konzentrationen nach Vitamin K-Applikation liegt wahrscheinlich darin, daß Vitamin K-epoxid schneller zu Vitamin K reduziert, als umgekehrt Vitamin K zu Vitamin K-epoxid oxidiert wird (Bechtold et al, 1983).

Ausgehend von Befunden von BLANCHARD et al (1981) wurde die Pharmakokinetik von Vitamin K₁ zusätzlich bei Patienten mit Lebercirrhose untersucht. Blanchard et al hatten bei Lebercirrhotikern eine verminderte Aktivität der Vitamin K abhängigen γ -Carboxylierung der Prothrombinprecursoren nachgewiesen. Dies bedingt eine erhöhte Konzentration einer anomalen Form des Prothrombins mit fehlenden γ -Carboxyglutaminsäureresten in der NH₂-terminalen Molekülregion. Dieses anomale Prothrombin besitzt dann keine gerinnungsphysiologische Aktivität. Da die γ -Carboxylierung der Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren eng mit der Oxidation des Vitamin K₁ zum Vitamin K₁-2,3-epoxid im sogenannten Vitamin K-Epoxid-Zyklus verbunden ist (WILLINGHAM und MATSCHNER, 1974; SUTTIE et al, 1978; SUTTIE, 1980; LARSON et al, 1981), müßte eine verminderte Aktivität der γ -Carboxylase mit Störungen im Vitamin K-Epoxid-Zyklus einhergehen.

Nach intravenöser Applikation von Vitamin K₁ war die apparente Clearance bei Lebercirrhotikern mit $2,2 \pm 0,86$ l/h gegenüber der Gesunder etwas geringer, während die Verteilungsvolumina nur geringfügig differierten. Bei Patienten mit Lebercirrhose waren die Halbwertszeiten der Verteilungsphase mit $1,13 \pm 1,20$ h, als auch die der Eliminationsphase mit $6,84 \pm 8,43$ h im Mittel länger als bei Gesunden. Die Verlängerung der Halbwertszeiten bei Patienten mit Lebercirrhose gegenüber gesunden Probanden läßt sich mit der bei diesen Patienten gestörten Leberfunktion und der damit verzögerten Aufnahme und Elimination des Vitamins durch die Leber erklären. Starke Streuung der gemessenen Werte ist auf die inhomogene Zusammensetzung der Patienten mit Lebercirrhose zurückzuführen, da diese aufgrund der geringen Anzahl nicht entsprechend dem Schweregrad der Erkrankung gruppiert werden konnten. So konnten die längsten Halbwertszeiten nach intravenöser Applikation bei dem Patienten H.K. mit $t_{1/2\alpha} = 3,18$ h und $t_{1/2\beta} = 21,57$ h gemessen werden. Bei diesem Patienten waren aber auch gleichzeitig die laborchemischen Parameter, die eine Einschränkung der Syntheseleistung der Leber anzeigen, am deutlichsten verändert: die Albuminkonzentration im Serum betrug $2,8$ g/100 ml und die Thromboplastinzeit nach Quick war auf 40 % der Norm erniedrigt. Bei den übrigen Patienten mit Lebercirrhose wurde eine Albuminkonzentration im Serum von $3,4 \pm 0,5$ g/100 ml und eine Thromboplastinzeit nach Quick von $55 \pm 2,5$ % der Norm bestimmt. Zusätzlich zur Störung der Syntheseleistung kam bei dem Patienten H.K. eine ausgeprägte Exkretionsstörung

der Leber zur Beobachtung (Tabelle 3). Beides zusammen, Einschränkung der Syntheseleistung und Exkretionsstörung, zeigten eine schwere Leberfunktionsstörung an.

- Zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit wurde sowohl den gesunden Probanden als auch drei Patienten mit Lebercirrhosen zusätzlich zur intravenösen Applikation Vitamin K oral in Form von Hartgelatinekapselfn verabreicht. Die Halbwertszeiten der Eliminationsphase verlängerten sich bei gesunden Probanden von $3,57 \pm 1,09$ h nach intravenöser Applikation auf $9,78 \pm 4,27$ h nach oraler Applikation bzw. bei Patienten mit Lebercirrhose von $6,84 \pm 8,43$ h auf $51,5 \pm 24,9$ h.

Die terminale Halbwertszeit für Vitamin K der Patienten mit Lebercirrhose war damit um über 40 Stunden länger als bei gesunden Probanden. Ursächlich hierfür könnte eine Hemmung der Elimination, eine Veränderung der Verteilung oder ein sogenannter "Flip-Flop-Effekt", das heißt, die Limitation der Elimination durch die stark verlangsamte Resorption sein. Für eine Hemmung der Elimination oder eine geänderte Verteilung finden sich aus den Ergebnissen nach intravenöser Applikation keine Hinweise, da sich bei den drei Patienten, denen Vitamin K₁ sowohl intravenös als auch oral appliziert wurde, weder in der apparenten Clearance noch im apparenten Verteilungsvolumen Unterschiede zu Gesunden nachweisen ließen.

Die Resorption der unpolaren Lipide, zu denen auch Vitamin K zählt, erfolgt nach deren Emulgierung in polymolekularen Aggregaten, den sogenannten Micellen, wobei die Gallensäuren

als Emulgatoren wirken (HOFFMANN und MEKHJIAN, 1973; CAREY und SMALL, 1972). Es ist bekannt, daß ein Mangel an Gallensäuren das Ausmaß der Resorption von Vitamin K vermindert (SHEARER et al, 1974; HOLLANDER, 1981). Patienten mit Lebercirrhose zeigen in 60 % eine, auf eine prä- und postmikrosomale Störung zurückzuführende Hyperbilirubinämie, die bei 30 % der Patienten von einer Aktivitätssteigerung der eine Cholestase anzeigenden Enzyme, der alkalischen Phosphatase und der γ -Glutamyl-Transpeptidase begleitet wird (de GROOTE, 1968; GROS, 1968). Die untersuchten Patienten zeigten allerdings bis auf den Patienten A.M. keine oder nur geringfügig erhöhte Werte der alkalischen Phosphatase und der γ -Glutamyl-Transpeptidase. Der Patient A.M. hatte zudem mit 29,08 Stunden die kürzeste Eliminationshalbwertszeit und mit 98 % die höchste Bioverfügbarkeit. Es gibt daher keinen Hinweis darauf, daß eine Resorptionsverzögerung von Vitamin K durch Cholestase verursacht wurde. Es ist weiterhin bekannt, daß 78 % der an Lebercirrhose Erkrankten eine Steatorrhoe aufweisen (WILLIAMS und SIDOROV, 1971). Eine intraluminale Erhöhung von Fettsäuren, insbesondere mehrfach ungesättigten Fettsäuren, bewirkt eine verminderte Resorption von Vitamin K (HOLLANDER, 1973; HOLLANDER et al, 1977). Obwohl die Patienten auf diese Begleiterkrankung hin nicht untersucht wurden, ist eine zugrundeliegende Steatorrhoe eher unwahrscheinlich, da sich in der absoluten Bioverfügbarkeit von Vitamin K zwischen Lebercirrhotikern ($F = 64,67 \pm 29,7 \%$) und gesunden Probanden ($F = 61,5 \pm 21,44 \%$) keine Unterschiede fanden. Daß sich zwischen

Gesunden und Lebercirrhotikern kein Unterschied in der Bioverfügbarkeit finden ließ, spricht dafür, daß die Halbwertszeit im Plasma nicht die Halbwertszeit der Elimination, sondern der Resorption widerspiegelt. Dieses Phänomen könnte durch eine ständige Nachresorption von Vitamin K₁ aus unteren Darmabschnitten bedingt sein. Die Ursache hierfür ist unklar.

Bei dem Patienten K.R. konnte nach oraler Applikation von Vitamin K₁ kein Vitamin K₁ im Plasma nachgewiesen werden. Dieser Patient hatte neben der Lebercirrhose eine chronisch rezidivierende Pankreatitis, eine schwere Maldigestion und Malabsorption mit Steatorrhoe, bei endoskopisch nicht pathologisch veränderter Dünndarmschleimhaut. Der Befund spricht dafür, daß sich die bei Malabsorption zu beobachtende verminderte Fettresorption und dadurch bedingte vermehrte Fettausscheidung mit den Fäces auch auf Vitamin K erstreckt.

Die Untersuchungen der Arbeit haben ergeben, daß sich mit der neuentwickelten Methode Vitamin K₁ im Plasma bestimmen läßt. Untersuchungen an Probanden ergaben ähnliche pharmakokinetische Daten wie die mit radioaktivem Material gewonnenen Ergebnisse. Vorläufige Untersuchungen bei Patienten mit Lebercirrhose lassen vermuten, daß die intravenöse Kinetik und der Metabolismus von Vitamin K₁ durch die Lebercirrhose nicht wesentlich beeinflußt wird. Es wurden jedoch Hinweise dafür gefunden, daß bei Lebercirrhose Vitamin K₁ langsamer und über einen größeren Zeitraum hinweg resorbiert wird.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Vitamin K₁ und Vitamin K₁-2,3-epoxid in Humanplasma entwickelt, die sich besonders für kinetische Untersuchungen eignet.

Nach Lipidextraktion erfolgte die Analyse auf einem Kapillarsäulen-Gaschromatographen, der mit einem Probengeber mit Stromteiler und einem Electron-Capture Detektor ausgestattet war. Es wurde eine Dünnschichtquarzkapillarsäule mit einer chemisch gebundenen flüssigen Phase verwendet. Die Probenaufgabe erfolgte nach der Methode von Grob, ohne Stromteilung.

Mit dem beschriebenen analytischen Verfahren konnten die cis- und trans-Isomere von Vitamin K₁-2,3-epoxid, Vitamin K₁ und Vitamin K₂(20) vollständig voneinander getrennt werden.

Die untere Nachweisgrenze betrug sowohl für Vitamin K₁ als auch für Vitamin K₁-2,3-epoxid 5 ng/ml für Reinsubstanzen ungefähr 10 - 20 pg.

Das analytische Verfahren zeichnet sich aus durch:

- eine hohe Trennleistung für Vitamin K₁, Vitamin K₁-2,3-epoxid und seine Isomere, sowie für Vitamin K₂ (20);
- eine Konstanz der Trennleistung über Monate bei mehreren Injektionen täglich;
- eine hohe Sensitivität und
- einen niedrigen Variationskoeffizienten.

Die kinetischen Daten von Vitamin K₁ wurden an vier gesunden Probanden und an fünf Patienten mit Lebercirrhose erhoben. Patienten mit Lebercirrhose hatten nach intrave-

nöser Vitamin K₁-Applikation im Mittel längere Halbwertszeiten sowohl der Verteilungs- als auch der Eliminationsphase, wobei die Einzelwerte allerdings stark streuten. Die apparente Clearance war bei Patienten mit Lebercirrhose im Mittel niedriger, während sich die apparenten Verteilungsvolumina nur geringfügig von denen Gesunder unterschieden. Nach oraler Applikation fiel vor allem die bei Lebercirrhotikern um über 40 Stunden längere Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2 \beta}$ auf. In der Bioverfügbarkeit bestand kein Unterschied zu Gesunden. Sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit Lebercirrhose ließen sich nach intravenöser und oraler Vitamin K₁-Applikation nur Spuren von Vitamin K₁-epoxid im Plasma nachweisen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- BECHTOLD, H. und JÄHNCHEN, E.: Quantitative analysis of vitamin K₁ and vitamin K₁ 2,3-epoxide in plasma by electron-capture gas-liquid chromatography. J. Chromatogr. 164, 85-90 (1979)
- BECHTOLD, H., TRENK, D., MEINERTZ, T., ROWLAND, M. und JÄHNCHEN, E.: Cyclic interconversion of vitamin K₁ and vitamin K₁ 2,3-epoxide in man. Br. J. Clin. Pharmacol. 16, 683-689 (1983)
- BELL, R.G. und MATSCHINER, J.T.: Warfarin and the inhibition of vitamin K activity by an oxide metabolite. Nature 237, 32-33 (1972)
- BELL, R.G.: Metabolism of vitamin K and prothrombin synthesis: anticoagulants and the vitamin K-epoxide cycle. Fed. Proc. 37, 2599-2604 (1978)
- BELL, R.G.: Vitamin K activity and metabolism of vitamin K₁ epoxide-1,4-diol. J. Nutr. 112, 287-292 (1982)
- BENET, L.Z. und GALEAZZI, R.L.: Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution. J. Pharm. Sci. 68, 1071-1074 (1979)
- BJORNSSON, T.D., MEFFIN, P.J., SWEZEY, S.E. und BLASCHKE, T.F.: Effects of clofibrate and warfarin alone and in combination on the disposition of vitamin K₁. J. Pharmacol. Exp. Ther. 210, 322-326 (1979)
- BLANCHARD, R.A., FURIE, B.C., JORGENSEN, M., KRUGER, S.F. und FURIE, B.: Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. N. Engl. J. Med. 305, 242-248 (1981)
- BLOMSTRAND, R. und FORSGREN, L.: Vitamin K₁-³H in man. Its intestinal absorption and transport in the thoracic duct lymph. Int. Z. Vitaminforsch. 38, 45-64 (1968)

- BUENO, M.P. und VILLALOBOS, M.C.: Reverse phase high pressure liquid chromatographic determination of vitamin K₁ in infant formulas. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1063-1066 (1983)
- CALDWELL, P.T., REN, P. und BELL, R.G.: Warfarin and metabolism of vitamin K₁. Biochem. Pharmacol. 23, 3353-3362 (1974)
- CAREY, M.C. und SMALL, D.M.: Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations. Arch. Intern. Med. 130, 506-527 (1972)
- CARLISLE, T.L. und SUTTIE, J.W.: Vitamin K dependent carboxylase: subcellular location of the carboxylase and enzymes involved in vitamin K metabolism in the rat liver. Biochemistry 19, 1161-1167 (1980)
- CARLISLE, D.M. und BLASCHKE, T.F.: Vitamin K₁, vitamin K₁ epoxide and warfarin interrelationships in the dog. Biochem. Pharmacol. 21, 2931-2936 (1981)
- CHIU, Y.J.D., ZEE-CHENG, R.K.J. und OLSON, R.E.: Determination of vitamin K₁ in human plasma. Fed. Proc. 40, 873 (1981)
- DAM, H.: The antihaemorrhagic vitamin of the chick. Biochem. J. 29, 1273-1285 (1935)
- FASCO, M.J. und PRINCIPI, L.M.: Vitamin K₁ hydroquinone formation catalyzed by a microsomal reductase system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1487-1492 (1980)
- GALE, P.H., PAGE, A.C., STOUTT, T.H. und FOLKERS, K.: Identification of vitamin K₂ (35), an apparent cofactor of a steroidal 1-dehydrogenase of *Bacillus sphaericus*. Biochemistry 1, 788-792 (1962)
- GAMBERTOGLIO, J.G., AMEND, W.J. und BENET, L.Z.: Pharmacokinetics and bioavailability of prednisone and prednisolone in healthy volunteers and patients: A review. J. Pharmacokinet. Biopharm. 8, 1-52 (1980)

- GLOOR, U. und WISS, O.: Resorption, Retention, Ausscheidung und Verteilung von Phyllochinon, Menachinon-4 und α -Tocopherolchinon im Vergleich zum α -Tocopherol bei der Ratte. *Helv. Chim. Acta* 49, 2590-2594 (1966)
- GROB, K. und GROB, G.: Splitless injection on capillary columns, part I. The basic technique; steroid analysis as an example. *J. Chromatogr. Sci.* 7, 584-591 (1969)
- de GROOTE, J.: Jaundice in chronic hepatitis and cirrhosis of the liver. In: *Ikterus* (BECK, K., ed.) 171-176, Stuttgart 1968
- GROS, H.: Zur Häufigkeit von Ikterus und Cholestase bei chronisch entzündlichen Lebererkrankungen. In: *Ikterus* (BECK, K., ed.) 177-178, Stuttgart 1968
- HAROON, Y., SHEARER, M.J. und BARKHAN, P.: Resolution of phylloquinone (vitamin K₁), phylloquinone 2,3-epoxide, 2-chloro-phylloquinone and their geometric isomers by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 200, 293-299 (1980)
- HAROON, Y., SHEARER, M.J., RAHIM, S., GUNN, W.G., McENERY, G. und BARKHAN, P.: The content of phylloquinone (vitamin K₁) in human milk, cows' milk and infant formula foods determined by high-performance liquid chromatography. *J. Nutr.* 112, 1105-1117 (1982)
- HAROON, Y. und HAUSCHKA, P.V.: Application of high-performance liquid chromatography to assay phylloquinone (vitamin K₁) in rat liver. *J. Lipid Res.* 24, 481-484 (1983)
- HART, J.P., NAHIR, A.M. und CHAYEN, J.: Determination of vitamin K₁ in plasma by differential pulse polarography and its possible clinical application. *Anal. Chim. Acta* 144, 267-271 (1982)
- HILDEBRANDT, E.F. und SUTTIE, J.W.: Mechanism of coumarin action: sensitivity of vitamin K metabolizing enzymes of normal and warfarin-resistant rat liver. *Biochemistry* 21, 2406-2411 (1982)

- HOFFMANN, A.F. und MEKHJIAN, H.S.: Bile acids and the intestinal absorption of fat and electrolytes in health and disease. In: The Bile Acids (NAIR, P.P. und KRITCHEVSKY, D. ed.) Plenum Press 103-152, New York 1973
- HOLLANDER, D.: Vitamin K₁ absorption by everted intestinal sacs of the rat. Am. J. Physiol. 225, 360-364 (1973)
- HOLLANDER, D., RIM, E. und MURALIDHARA, K.S.: Vitamin K₁ intestinal absorption in vivo: influence of luminal contents on transport. Am. J. Physiol. 232, E 69 - E 74 (1977)
- HOLLANDER, D.: Retinol lymphatic and portal transport: influence of pH, bile, and fatty acids. Am. J. Physiol. 239, G 210-G 214 (1980)
- HOLLANDER, D.: Intestinal absorption of vitamins A,E,D, and K. J. Lab. Clin. Med. 97, 449-462 (1981)
- JENKINS, J.S. und SAMPSON, P.A.: Conversion of cortisone to cortisol and prednisone to prednisolone. Br. Med. J. 2, 205-207 (1967)
- KAISER, R.: Chromatographie in der Gasphase. Kapillar-Chromatographie, Dünnfilm- und Dünnschichtkapillar-GC; Bd. 2, 176, Mannheim 1975
- LARSON, A.E., FRIEDMANN, P.A. und SUTTIE, J.W.: Vitamin K-dependent carboxylase: stoichiometry of carboxylation and vitamin K 2,3-epoxide formation. J. Biol. Chem. 256, 11032-11035 (1981)
- LEFEVRE, M.F., LEENHERR, A.P. und CLAEYS, A.E.: High-performance liquid chromatographic assay of vitamin K in human serum. J. Chromatogr. 186, 749-762 (1979)
- LEFEVRE, M.F., LEENHERR, A.P., CLAEYS, A.E., CLAEYS, I.V. und STEYAERT, H.: Multidimensional liquid chromatography: a breakthrough in the assessment of physiological vitamin K levels. J. Lipid. Res. 23, 1068-1072 (1982)

- LOSITO, R. und MILLAR, G.J.: Preparative separation of vitamins K₁ and K₃ from vitamins K₂(30) and K₂(35) by column chromatography. J. Chromatogr. 14, 496-498 (1964)
- MATSCHINER, J.T., BELL, R.G., AMELOTI, J.M. und KNAUER, T.E.: Isolation and characterization of a new metabolite of phylloquinone in the rat. Biochim. Biophys. Acta 201, 309-315 (1970)
- METZLER, C.M., ELFRING, G.L. und McEWEN, A.J.: A user's manual for NONLIN and associated programs. Kalamazoo, Michigan: The Upjohn Co., 1974
- NELSESTUEN, G., ZYTKOVICZ, T.H. und HOWARD, J.B.: The mode of action of vitamin K. Identification of γ -carboxy-glutamic acid as a component of prothrombin. J. Biol. Chem. 249, 6347-6350 (1974)
- OLSON, R.E. und SUTTIE, J.W.: Vitamin K and γ -carboxy-glutamate biosynthesis. Vitam. Horm. 35, 59-108 (1977)
- PARK, B.K., LECK, J.B., WILSON, A.C., SERLIN, M.J. und BRECKENRIDGE, A.M.: A study of the effects of anti-coagulants on ³H-vitamin K₁ metabolism and prothrombin complex activity in the rabbit. Biochem. Pharmacol. 28, 1323-1329 (1979)
- SADOWSKI, J.A. und SUTTIE, J.W.: Mechanism of action of coumarins. Significance of vitamin K epoxide. Biochemistry 13, 3696-3699 (1974)
- SADOWSKI, J.A., SCHNOES, H.K. und SUTTIE, J.W.: Vitamin K epoxidase: properties and relationship to prothrombin synthesis. Biochemistry 16, 3856-3863 (1977)
- SCHMIDT, W., BEERMANN, D., OESCH, F. und JÄHNCHEN, E.: Differential effect of the enantiomers of phenprocoumon and warfarin of the vitamin K₁-epoxide/vitamin K₁ ratio in rat plasma. J. Pharm. Pharmacol. 31, 490-491 (1979)
- SEIFERT, R.M.: Analysis of vitamin K₁ in some green leafy vegetables by gas chromatography. J. Agric. Food. Chem. 27, 1301-1304 (1979)

- SHAH, D.V. und SUTTIE, J.W.: Mechanism of action of vitamin K: evidence for the conversion of a precursor protein to prothrombin in the rat. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1653-1657 (1971)
- SHEARER, M.J., BARKHAN, P. und WEBSTER, G.R.: Absorption and excretion of an oral dose of tritiated vitamin K₁ in man. Br. J. Haematol. 18, 297-308 (1970)
- SHEARER, M.J., MALLIKSON, C.N., WEBSTER, G.R. und BARKAN, P.: Clearance from plasma and excretion in urine, faeces and bile of an intravenous dose of tritiated vitamin K₁ in man. Br. J. Haematol. 22, 579-588 (1972)
- SHEARER, M.J., MCBURNEY, A. und BARKHAN, P.: Effect of warfarin anticoagulation on vitamin K₁ metabolism in man. Br. J. Haematol. 24, 471-479 (1973)
- SHEARER, M.J., MCBURNEY, A. und BARKHAN, P.: Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K₁) in man. Vitam. Horm. 32, 513-542 (1974)
- SHEARER, M.J., MCBURNEY, A., BRECKENRIDGE, A.M. und BARKHAN, P.: Effect of warfarin on the metabolism of phylloquinone (vitamin K₁): dose-response relationship in man. Clin. Sci. 52, 621-630 (1977)
- SHEARER, M.J., ALLAN, V., HAROON, Y. und BARKHAN, P.: Nutritional aspects of vitamin K in the human. In: Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins (SUTTIE, J.W., ed.), 317-327, Baltimore 1980
- SHEPHERD, A.M.M., WILSON, N.M. und STEVENSON, I.H.: Vitamin K pharmacokinetics: response in young and elderly patients. Clin. Pharmacol. Ther. 21, 117 (1977)
- SIEGFRIED, C.M.: Studies of the vitamin K epoxide reductase system. In: Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins (SUTTIE, J.W., ed.), 354-360 Baltimore 1980
- STENFLO, J., FERNLUND, P., EGAN, W. und ROEPSTORFF, P.: Vitamin K-dependent modifications of glutamic residues in prothrombin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2730-2733 (1974)

- STENFLO, J. und SUTTIE, J.W.: Vitamin K-dependent formation of γ -carboxyglutamic acid. Annu. Rev. Biochem. 46, 157-172 (1977)
- SUTTIE, J.W., LARSON, A.E., CANFIELD, L.M. und CARLISLE, T.L.: Relationship between vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K epoxidation. Fed. Proc. 37, 2605-2609 (1978)
- SUTTIE, J.W.: Mechanism of action of vitamin K: synthesis of γ -carboxyglutamic acid. CRC Crit. Rev. Biochem. 8, 191-223 (1980)
- SUTTIE, J.W., GENEKE, L.O., MARTIN, S.L. und WILLINGHAM, A.K.: Vitamin K epoxidase: dependence of epoxidase activity on substrates of the vitamin K-dependent carboxylation reaction. FEBS Lett. 109, 267-270 (1980)
- TAGGERT, W.V.: The metabolism of menadione -6,7 ^3H and phyloquinone-6,7 ^3H in the rat. Dissertation abstracts, International, 30, 1506-B (1969)
- TRENK, D., BEERMANN, D., OESCH, F. und JÄHNCHEN, E.: Age-dependent differences in the effect of phenprocoumon on the vitamin K₁-epoxide cycle in rats. J. Pharm. Pharmacol. 31, 828-832 (1980)
- WHITLON, D.S., SADOWSKI, J.A. und SUTTIE, J.W.: Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K-epoxide reductase inhibition. Biochemistry 17, 1371-1377 (1978)
- WILLIAMS, C.N. und SIDOROV, J.: Steatorrhea in patients with liver disease. Can. Med. Assoc. J. 105, 1143-1146 (1971)
- WILLINGHAM, A.K. und MATSCHINER, J.T.: Changes in phyloquinone epoxidase activity related to prothrombin synthesis and microsomal clotting activity in the rat. Biochem. J. 140, 435-441 (1974)
- ZIMMERMANN, A. und MATSCHINER, J.T.: Biochemical basis of hereditary resistance to warfarin in the rat. Biochem. Pharmacol. 23, 1033-1040 (1974)

VII. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

kg, mg, μ g	Kilogramm, Milligramm, Mikrogramm
ng, pg	Nanogramm, Pikogramm
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
U/l	Internationale Einheit pro Liter
v/v	Volumen pro Volumen
MG	Molekulargewicht
h, sec	Stunde, Sekunde
U/Min	Umdrehung pro Minute
cm, mm	Zentimeter, Millimeter
m Ci	Millicurie
Ni	Nickel
$\bar{x}$	Mittelwert
S_x	Standardabweichung vom Mittelwert
r	Korrelationskoeffizient
n	Anzahl
SGOT	Serum-Glutamat-oxalazetat-transaminase
AP	alkalische Phosphatasen
γ -GT	gamma-Glutamyl-transpeptidase

L e b e n s l a u f

Am 02.10.1957 wurde ich als Sohn der Eheleute Ernst Klein und Beate, geborene Dazert in Irlich, jetzt Neuwied, geboren.

Von 1964 bis 1966 besuchte ich die Grundschule in Krufthaus und anschließend bis 1967 die Grundschule in Neuwied-Irlich. Im Sommer 1967 wechselte ich zum Werner Heisenberg-Gymnasium in Neuwied, wo ich 1976 die Reifeprüfung ablegte. Im April 1977 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Im Oktober 1983 legte ich das medizinische Staatsexamen ab.

Seit dem 1.1.1984 leiste ich den Grundwehrdienst als Stabsarzt in Koblenz ab.

